以葉綠素螢光進行草莓種苗之病害檢測

邱奕志[1]、徐偉智[2]

[1]國立宜蘭大學生物機電工程學系 教授

[2]國立宜蘭大學生物機電工程學系 碩士

摘要

本研究目的旨在利用研製之攜帶型葉綠素螢光影像檢測系統進行草莓種苗病害檢測之研究，驗證此系統是否能拍攝出葉面上遭受病害之受損部位。並透過 Mini-PAM 葉綠素螢光量測儀量測草莓種苗之光量子產量值，判斷植株是否有受逆境影響。本研究以豐香草莓苗進行試驗，苗齡 15 天，以螢光分光光譜儀分析草莓苗螢光特性，分析結果顯示：健康草莓苗與罹病草莓苗之激發光波長落於 460 nm，放射光波長為 680 nm，其激發光相對強點之光譜範圍落於 420–490 nm，放射光相對強點之光譜範圍落於 670–690 nm 之間。本研究並以高溫逆境將實驗組之草莓苗放入 38℃/30℃(日/夜)，濕度 80%之生長箱中以誘導病斑。試驗結果顯示：10 株草莓苗中，有 5 株誘導病斑成功，並利用研製之攜帶型葉綠素螢光影像檢測系統進行檢測，結果顯示：研製之攜帶型葉綠素螢光影像檢測系統可較肉眼提早 16 小時發現病斑，研製之系統具有實用化之價值，可進一步商品化應用於育苗產業之管理。

關鍵詞：葉綠素、螢光、影像檢測、草莓、種苗。

一、前言

育苗模式在不斷的精進下，穴盤育苗漸漸地成為主流，有著生產效率高、移栽快速及操作簡便之優點。透過精量播種可一次成苗，並根據幼苗生長的需要，利用有機、天然材料及微生物制劑配製而成的人工土壤，使農民可利用健康良好的種苗，因而能降低生產成本，增加產業收益。然而穴盤育苗屬於密集栽培，一旦植株有病害產生，病害的發生及蔓延極其快速，使整個育苗床的植株皆可能被感染危害，甚至造成植株之死亡，形成嚴重之損害(陳和戴，2000)。為了防止上述情況發生，育苗業者在早期檢測病害時為重要關鍵，提早得知植物種苗是否有病害成為各單位研究的課題。

利用葉綠素螢光成像技術來針對早期發現疾病症狀是一種具潛力之技術，為一種快速且非破壞性分析植物逆境的方法。許多研究亦指出，可利用葉綠素螢光檢測植物與環境、化學或生理下逆境之關係。諸如Chaerle and Streaten (2001) 指出利用螢光影像判斷植物在逆境下之狀態是可行的；Krumov et al. (2008) 將乾旱與高溫脅迫下之植物，利用葉綠素光影像系統掌握植物之生理狀態；Lichtenthaler and Babani (2000)利用葉綠螢光影像系統量測植物之光合作用與水分逆境下之狀態；Qin et al. (2008) 利用高光譜影像和光譜訊息分析檢測柑桔瘀傷；Mendoza et al. (2010) 整合高光譜散射和圖像分析技術改進預測蘋果果實硬度

和可溶性固形物含量；Chaerle et al. (2007) 應用葉綠素螢光影像檢測技術，進行於草早期疾病症狀預防。

謝(2006)以飽和脈衝葉綠素螢光建立影像系統，可進行植物光熱逆境之生理檢測與分析；以葉綠素螢光監測蔬果嫁接苗之生理反應，主要使用葉綠素螢光檢定儀量測嫁接苗葉片之葉綠素螢光，探討不同的環境逆境下嫁接苗葉片的表現 (張等，2005)；本實驗室前人針對葉綠素螢光影像進行非破壞性檢測也有相關研究。Chiu and Chen (2011)利用葉綠素螢光影像進行金冠蘋果瘀傷檢測系統之開發；Chiu and Chen (2014)利用葉綠素螢光影像檢測蘋果瘀傷並研製一套線上型檢測系統。

由上面文獻探討證實，利用葉綠素螢光成像技術來針對早期發現疾病症狀是一種具高潛力之技術。因此本研究目的旨在以葉綠素螢光影像系統進行草莓種苗病害檢測與分析，利用螢光分光譜儀探討草莓種苗病害與葉綠素螢光之間的關係，並利用研製之攜帶型葉綠素螢光影像系統進行拍攝，以達到葉面病害在肉眼難以辨識前，即能偵測得知，以達到提早預防種苗病害之效果。

二、材料與方法

2.1 草莓種苗之螢光特性試驗

為確保葉綠素螢光可進行草莓種苗病害檢測，首先採用螢光分光譜儀Hitachi F4500分析草莓種苗之螢光光譜特性，利用Hitachi F4500之3D Scan光譜功能，可得知健康與病害之草莓種苗光譜不同處，進一步找出適合之激發光源與放射光源濾鏡。本研究掃描的激發光範圍從200 nm至900 nm，接收螢光放射光源從600 nm至800 nm，每隔5 nm為一刻度。

2.2 以高溫逆境產生病害之螢光參數量測試驗

從種苗場購置苗齡15天之豐香品種草莓種苗，共20株，將其分為對照組與實驗組共兩組，每組10株。將兩組種苗放入日/夜溫25℃/20℃，相對濕度80%之生長箱內3天，讓草莓種苗適應生長箱環境。3天後苗齡為18天，開始將實驗組環境改為日/夜溫38℃/30℃，相對濕度80%之生長箱內，對照組維持日/夜溫25℃/20℃。利用葉綠素螢光儀Mini-PAN量測草莓種苗葉面之螢光參數，包括：F_0、F_m、F_v、及F_v/F_m之比值等，並計算葉綠素螢光總產量Yield值。每株種苗量測6點，持續觀察256小時，探討螢光產量Yield值，證明作物是否受高溫逆境，導致影響PSⅡ電子的傳遞，降低Fv/Fm的比值。

2.4 病害斑點面積實際大小校正試驗

由於激發螢光病斑影像大小受到激發光源與擷取距離影響，故設計此試驗進行攜帶型葉綠素螢光影像系統之拍攝距離與螢光影像像素大小關係，並建立影像像素於不同拍攝距離下之轉換曲線。病害斑點面積實際大小校正試驗方法為，於A4大小白紙中央，利用印表機列印出實際大小為1 cm2之正方形，將紙平放於攜帶型葉綠素螢光影像系統攝影機下，拍攝距離從50 mm～300 mm，每50 mm為一個單位，最終將統計不同拍攝距離下每1 cm2與影像像素點大小之轉換曲線，做為本系統之病斑影像大小轉換曲線之參考值。

為了瞭解本系統判斷之病斑大小之誤差，本研究以人工圈選影像病斑方式作為標準

值，與系統判斷之病斑大小進行比較，作為系統判斷病斑大小之誤差參考。人工圈選影像病斑方式為，將含有病斑之螢光影像匯入小畫家軟體，以人工方式圈選出病斑部分，將病斑處塗黑，其餘部分塗白，作為人工判斷之病斑影像，再以此影像之像素依照本節求得之影像像素點大小之轉換曲線進行實際大小換算，以此作為病斑大小之標準值。

2.5 攜帶型葉綠素螢光影像檢測系統之戶外試驗

為了檢驗本系統是否可於戶外作業，本研究實際前往台灣草莓產地大湖鄉之慶豐草莓園進行試驗，試驗方法為隨機挑選種植於該園之草莓植株15株進行拍攝，並將結果紀錄，進行分析。

三、結果與討論

3.1 草莓種苗螢光光譜表現

圖1與圖2分別代表健康草莓種苗與病害草莓種苗之螢光光譜表現。透過儀器分析得知，健康與病害之草莓種苗，其較強之螢光能量介於激發光譜420–490 nm與放射光譜670–690 nm之間。其中激發光波長460 nm之激發光放射於波長680 nm之螢光放射有最強之螢光能量。由圖1與圖2可得知草莓種苗螢光光譜較強之螢光能量介於激發光譜420–490 nm與放射光譜670–690 nm之間，將其資料整理後，得出最大激發波長為460 nm (圖1) ，最大放射波長為680 nm (圖2) ，其健康草莓種苗之螢光放射強度為106.4，病害草莓種苗之螢光放射強度為58.8。本試驗結果提供激發光源與影像擷取濾鏡選購上之參考。

3.2 以高溫逆境產生病害之草莓種苗螢光量試驗結果

以MINI-PAM量測草莓種苗之螢光量子產量，量測時間則為每8小時量測一次，分析作物受高溫逆境影響之光量子產量變化趨勢，試驗結果如圖3所示。草莓種苗之實驗組與對照組在未處理的情況下，Yield值初始在0.78與0.77，隨著時間的增加，對照組第200小時Yield值下降為0.77，實驗組第200小時Yield值下降為0.65。本研究將F0、Fm’、Fv數值進行統整分別以圖4-圖6所示，針對圖4部分，試驗200小時中，實驗組F0值高於對照組F0值，表示實驗組之最小螢光量上升；圖5部分，實驗組Fm’值低於對照組Fm’值，表示實驗組之最大螢光量下降；圖6部分，將上述統計之平均Fm’值與平均F0值進行相減之動作，得出Fv值，可得出實驗組Fv值低於對照組Fv值之結果，表示實驗組之螢光變異量整體下降。

3.3 以高溫逆境產生病斑之偵測與分析

使用攜帶型葉綠素螢光影像系統拍攝高溫逆境產生病害試驗結果，草莓實驗組共有5株產生斑點，以其中較為明顯之草莓種苗進行探討，病斑發現時間介於112~128小時，將附近實驗時間結果進行觀察發現，如圖7所示。觀察發現在96小時，螢光影像逐漸有黑點產生，上彩影像也可看出，但實際影像尚未發現斑點，112小時，螢光影像有較明顯黑點，實際影像可用肉眼勉強辨識出有斑點產生，而在120小時，螢光影像已有明顯黑點，實際影像也已經可以用肉眼明顯看出斑點。由此顯示，葉綠素螢光影像系統可比實際影像提早16小時拍攝到斑點。

本研究利用圖控式程式語言LabVIEW 2011將單張螢光影像之灰階值進行統計，求出該

張螢光影像之最大灰階值後，將最大灰階值之數值等分成七等分，於七等分內之灰階區間，分別由大到小之順序塗上紅(60–70)、橙(50–60)、黃(40–50)、綠(30–40)、藍(20–30)、靛(10–20)、紫(0–10)等七種顏色，透過上彩螢光影像，使操作者進一步容易分辨出植株之螢光強度大小。

3.4 病害斑點面積實際大小校正試驗結果

針對圖7該株草莓苗進行面積實際大小校正試驗，該株草莓苗病斑於試驗時間104小時期間發現，其結果如圖8所示，依照人工判斷病斑面積變化，該株草莓於試驗時間104小時至200小時之間，其病斑面積從0.433 mm^2變化至2.614 mm^2，系統判斷之變化為0.500 mm^2變化至2.701 mm^2，其對大誤差為15.38%，最小誤差為1.85%，平均誤差為7.11%。

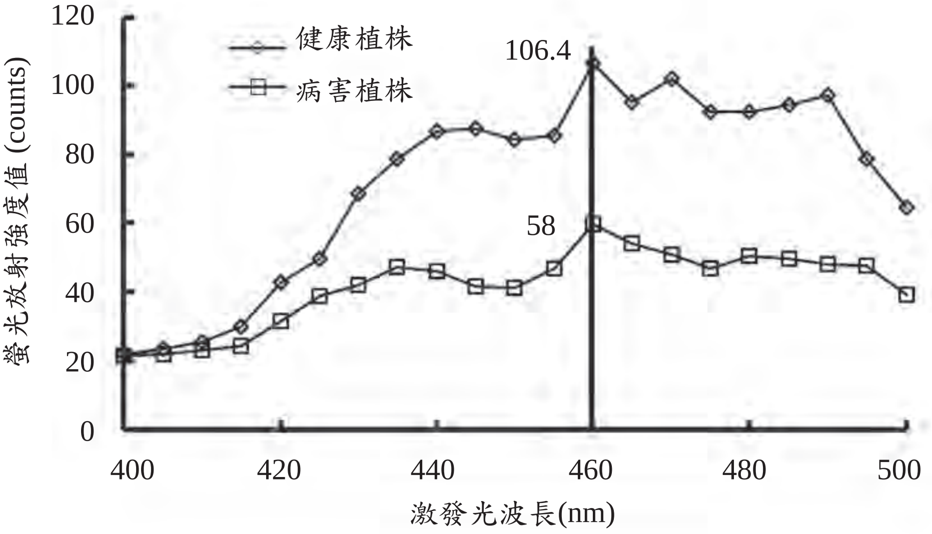

圖1 草莓苗在放射光波長680 nm下不同激發光波長之螢光放射強度分析

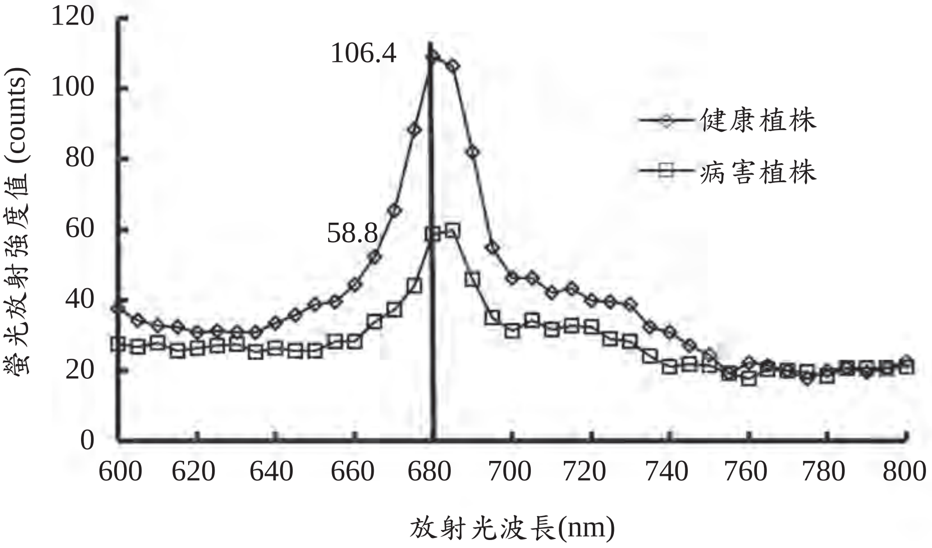

圖2 草莓苗在激發光波長460 nm下不同螢光放射波長之螢光放射強度分析

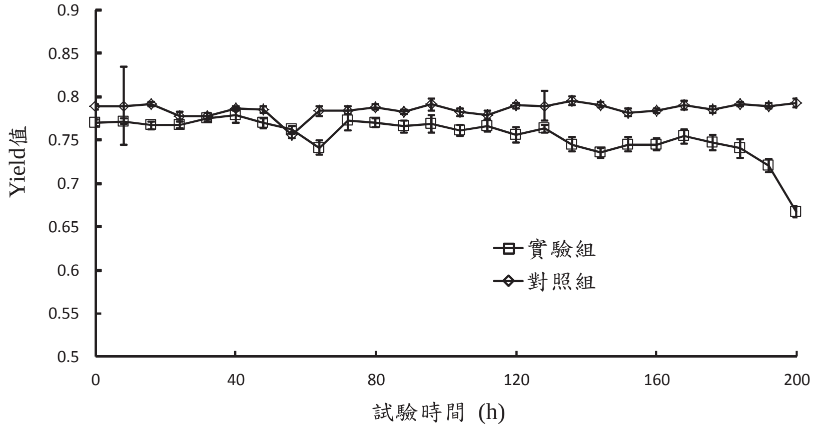

圖3 高溫逆境之草莓種苗螢光量子產量值變化

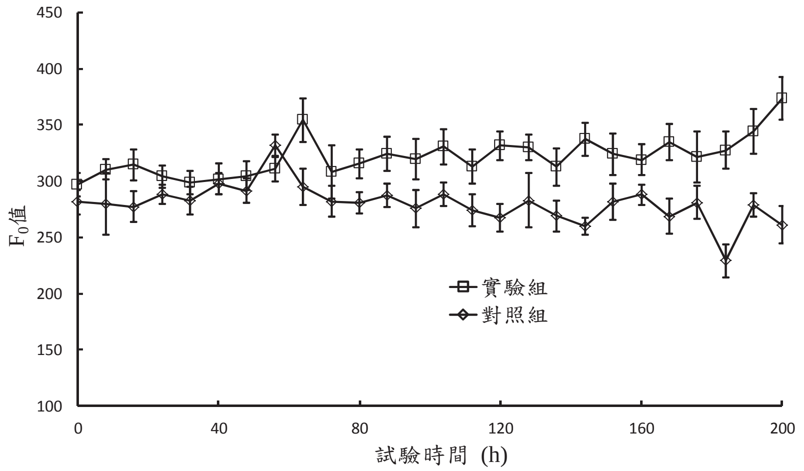

圖4 高溫逆境之草莓種苗最小螢光量數值變化

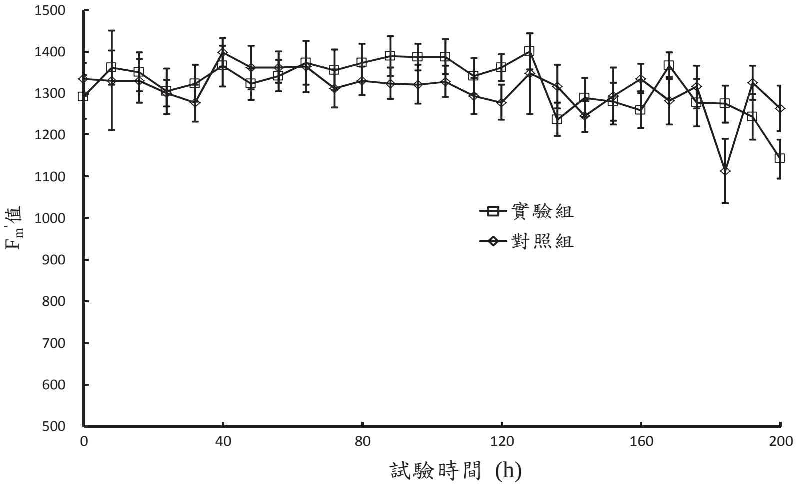

圖5 高溫逆境之草莓種苗最大螢光量數值變化

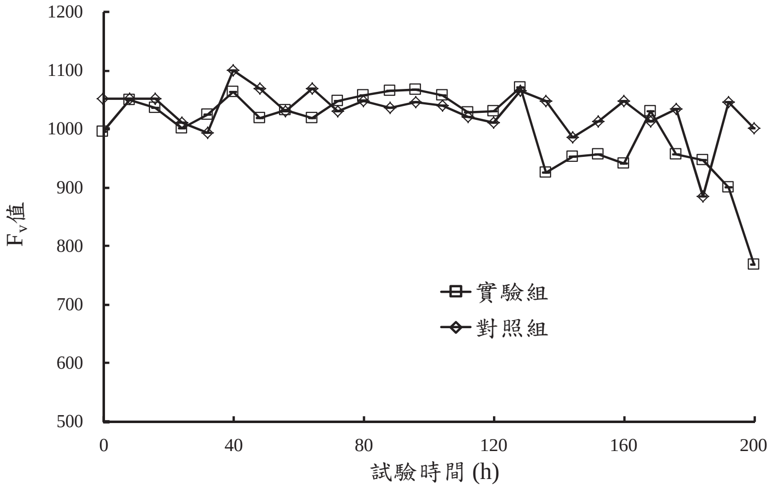

圖6 高溫逆境之草莓種苗螢光變異量數值變化

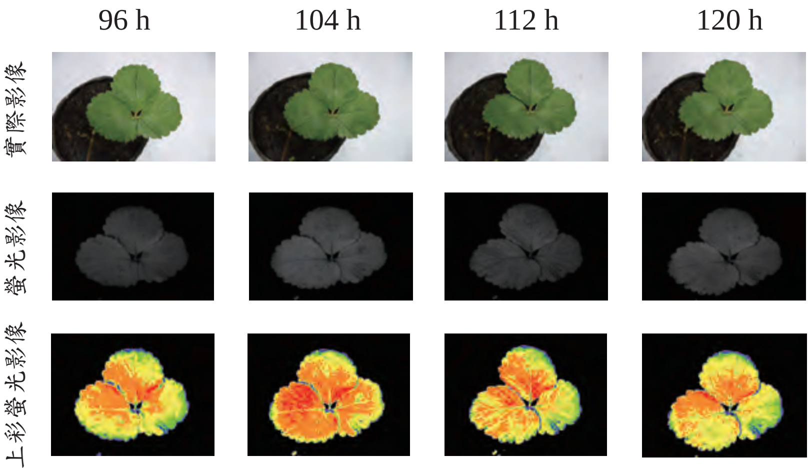

圖7 草莓種苗於試驗時間內葉綠素螢光影像與實際影像比較

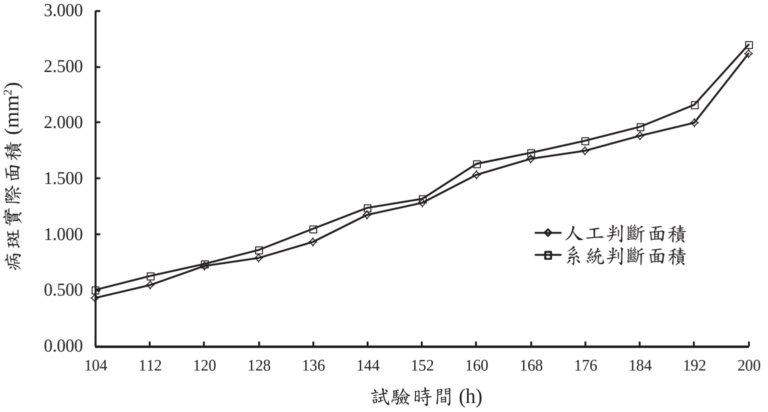

圖8 以高溫逆境產生病斑之面積變化情形

3.5 攜帶型葉綠素螢光影像檢測系統之戶外試驗結果與分析

本系統透過激發光系統所激發之藍光對待測植株進行螢光影像拍攝，拍攝時皆會以遮光布進行背景光隔離，降低干擾。拍攝方法可選擇設於拍攝架上與以單手手持之方式拍攝。兩者不同處在於，使用拍攝架可提供操作者比較穩定之影像，且雷射測距儀安裝於拍攝架之上，能提供操作者病斑大小之資訊。而利用手持式拍攝螢光影像，雖然影像較不穩定，但較能快速得知病斑所在位置，適用於戶外大量快速檢測之時機。上述兩種拍攝方法皆可在人機介面端顯示出系統判斷結果，拍攝到之螢光影像將透過控制與分析系統進行影像處理，最後將處理完之影像顯示於人機介面，讓操作者察看結果，且本系統提供即時影像檔案儲存功能，能讓在操作者面對大量的作業量中，精確地將每張影像儲存，提供操作者檢視使用。

為了檢驗本系統是否可於戶外作業，本研究於民國102年10月21日實際前往台灣草莓產地大湖鄉之慶豐草莓園進行試驗，試驗方法為隨機挑選種植於該園之草莓植株15株進行拍攝(圖9)。將15株草莓種苗實際狀態紀錄並與系統判斷分析進行對照，如表2所示，其中有11株為系統判斷與實際情況相同，4株與實際情況不同，成功率為73.3%。

系統判斷與實際狀況相同之11株裡有6株葉面有病斑，這6株中有5株判斷結果含有雜訊，1株無含雜訊，其精準度為16.6%。由此結果分析，針對螢光影像部分，實際拍攝可順利進行，對機器運作並無太大障礙。病斑判斷有雜訊產生之部分，推斷主要原因為實際拍攝時，由於當時果園裡有陣風干擾，使得遮光布無法完全阻擋外界光源感擾，導致儀器判斷產生偏差。

四、結論

本研究之高溫逆境實驗中，實驗組10株草莓苗中，有5株誘導病斑成功，並利用本系統拍攝之結果，以其中1株說明，肉眼發現病斑時間約處於試驗時間112–128小時之間，本系

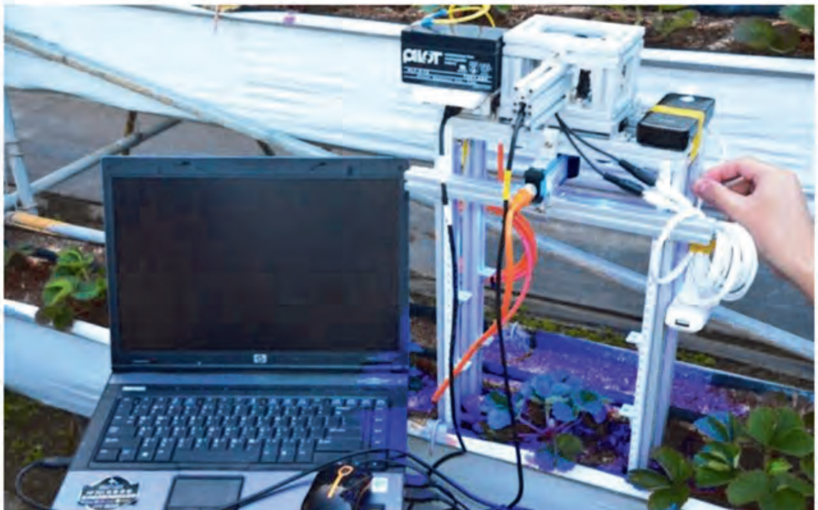

圖9 攜帶型葉綠素螢光檢測系統實際使用實際圖

統可於試驗時間96–112小時，即可看見病斑影像，相當於提早16小時即可發現病斑。影像方面，在第96小時之螢光影像中可看出有黑點產生，而實際影像在112小時可勉強辨識出斑點產生，從實驗影像結果顯示，此系統可比實際影像提早16小時發現斑點，而斑點從開始發現到試驗結束實際面積變化為0.433–2.614 mm^2。研製之系統具有實用化之價值，可進一步商品化應用於育苗產業之管理。

五、參考文獻

1. 張允瓊、鄔家琪、邱奕志、林連雄。2005。以葉綠素螢光做為監測嫁接苗生理反應指標之研究。2005年農機與生機論文發表會 p241–242。屏東。
2. 陳俊位、戴振洋。2012。十字花科蔬菜穴盤苗常見之病害種類及防治方法。行政院農業委員會台中區農業改良場。網址：http://tdares.coa.gov.tw/view.php?catid=2342。上網日期：2012-09-15。
3. 謝騄璘。2006。飽和脈衝葉綠素螢光影像系統之建立及於植物光熱逆境生理之應用。碩士論文。台北：國立台灣大學生物產業機電工程學研究所。
4. Chaerle, L., and D. V. D. Straeten. 2001. Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. Biochimica et Biophysica Acta. 1519: 153–166.
5. Chaerle, L., S. Lenk, D. Hagenbeek, C. Buschmann, and D. V. D. Straeten. 2007. Multicolor fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. Journal of Plant Physiology 164: 253–262.
6. Chiu, Y. C., and C. H. Chen. 2014. Development of on-line apple bruise detection system. The 18th World Congress of CIGR. Paper No. #0514-008. China: Beijing.
7. Chiu, Y. C., W. C. Hsu, Y. C. Chang. 2014. Detecting Cabbage Seedling Diseases by Using Chlorophyll Fluorescence. Engineering in Agriculture, Environment and Food (In Press).
8. Chiu, Y. C., and M. T. Chen. 2011. A study of apple bruise detection by using chlorophyll fluorescence image. 2011 ASABE Meeting Paper No. 1110558. Louisville, KY.
9. Krumov, A., A. Nikolova, V. Vassilev and N. Vassilev. 2008. Assessment of plant vitality detection through fluorescence and reflectance imagery. Advances in Space Research 41: 1870–1875.
10. Lichtenthaler, H. K., F. Babani. 2000. Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. Plant Physiol 38: 889−895.
11. Mendoza, F., R. Lu, D. Ariana, H. Cen, B. Bailey. 2010. Integration of hyperspectral scattering characteristics and image analysis techniques for improved prediction of apple fruit firmness and soluble solids content. ASABE Paper NO. 1008689. David L. Lawrence Convention Center Pittsburgh, Pennsylvania, MI: ASABE.
12. Qin, J., T. F. Burks, M. A. Ritenour, G. W. Bonn. 2008. Detecting citrus canker by hyperspectral reflectance imaging and spectral information divergence. ASABE Paper NO. 084066. Rhode Island Convention Center Providence, Rhode Island, MI: ASABE.

Disease Detection on Strawberry Seedlings using Chlorophyll Fluorescence

Yi-Chich Chiu[1], Wei-Chih Hsu[2]

[1] Professor, Department of Biomechatronic Engineering, National Ilan University
[2] Master, Department of Biomechatronic Engineering, National Ilan University

Abstract

The objective of this research was to establish a portable chlorophyll fluorescence imaging detection system to detect strawberry seeds disease research, and verify the system is able to capture parts of the disease area from strawberry leafs. By using Mini-PAM chlorophyll fluorescence detection instrument to measure the fluorescent quantum yield, and determine the plants affected from adversities. In this study experiments was using Toyonoka Strawberry seedling and it was 15 days old, and verify the strawberry fluorescence features by instrumentation of spectrum fluorescence meters. The test results showed as below: the excitation wavelength of the health and disease for the Toyonka Strawberry seedling was 460nm, the emission wavelength was 680nm, the wavelength ranging between 420-490nm were used to excite fluorescence, the spectral range of relative strengths emitted was between 670–690nm. In this study, setting the strawberry seedlings into plant growth chamber as the high-temperature stress environment to induced spots, the experimental parameters as ambient temperature was 38 ℃/30℃ (day/night), and the humidity was 80% R.H. The test results showed: under the processing environment, there are 5 of 10 strawberry seedlings improve having spots success, and then detect by using portable chlorophyll fluorescence imaging detection. The results showed this portable chlorophyll fluorescence imaging detection system can find disease spot 16 hours earlier than naked eyes, the detect system has practical value and could be applied in nursery industry management.

Keywords: Chlorophyll, Fluorescence, Imaging Detection, Strawberry, Seedling.